

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350144

研究課題名(和文) 加齢による血栓傾向とその日内リズムを改善する食品成分探索と新規機能性食品の開発

研究課題名(英文) Exploration of antithrombotic substance and development of new functional foods that prevent aging induced thrombotic conditions

研究代表者

大藏 直樹 (Ohkura, Naoki)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60349256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢により乱れた血液凝固系やその日内リズムを改善する健康食品を見出し、高齢者の血栓症予防に応用することが本研究の目的である。血栓を予防するとされる食品を対象に探索を行い、応用の可能性のある食品やその成分を見出した。これらの中で、明日葉の黄汁は、マウスに摂取させると老化に伴う血栓傾向が改善されることがわかった。また、明日葉に含まれるキサントアンゲロールのゲラニル基が効果の発現に重要であることを示した。本研究の成果は、健康食を利用して高齢者の血栓性疾患を予防する機能性食品が開発できる可能性を示すものである。日内リズムを考慮する部分については、今後の追加検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to identify new health foods that improve thrombotic condition induced by aging. We explored antithrombotic substance and found some new candidates. We showed that Ashitaba have antithrombotic potential in aged mice. We also showed that the geranyl group in xanthoangelol from Ashitaba played an important role in this process. This study showed that the intake of health food might have potential for preventing thrombotic disorders by decreasing prothrombotic states in elderly. However, further investigation is needed with respect to considering circadian rhythm of blood coagulation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：機能性食品 血栓症 加齢

1. 研究開始当初の背景

高齢になると発生頻度が高くなる虚血性心疾患や脳血管疾患などの血栓性疾患は、加齢による凝固系や血管の変化が原因になっており、加齢によるこのような変化の正常化は血栓性疾患予防のために有効であると考えられている。

血液凝固反応には日内リズムがあり、加齢が原因で正常な日内リズムは変調するため、血栓性疾患の予防や治療はリズムも考慮すると効果的になる可能性がある。

一方、食品の摂取による血栓予防では、様々な食品の有効性が示唆され、多くの高齢者が効果を期待して摂取していると思われる。しかし、有効性の根拠のない食品も多く、予防に役立てるためには、有効性を明らかにするだけでなく、有効成分の特定と機能の解明も必要である。また、日内リズムやその変調を考慮して摂取する時間を工夫すれば、より効果的な利用が可能になると思われる。

2. 研究の目的

本研究の第一段階の目的は、抗血栓作用を持つ食品成分の探索であるが、いくつかの候補の中で、特に、あした葉、プロポリス、黒酢とその醗に注目して研究を進めた。これらが持つとされる抗血栓作用を実験で証明し、作用する物質を特定すること、また、加齢により乱れた血液凝固系を改善するという発想で、高齢者の血栓予防に利用できるかどうかを、加齢マウスを用いて明らかにすることを目指した。その成果は、日常の食生活から高齢者の血栓性疾患を予防する新たな機能性食品の開発に繋がる基礎データと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 健康食からの血栓予防成分の探索と特定

培養細胞による評価系

培養した血管内皮細胞 (HUVEC 又は EA.hy926) に、被検物質を添加し DMEM 培地でさらに 3 時間培養した後、腫瘍壊死因子 (TNF) で刺激した。刺激により培地中に増加するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) を ELISA 法によって測定した。TNF 刺激による PAI-1 産生増加を被検物質の添加がどの程度抑制したか調べ有効性を評価した。

血小板凝集による評価系

ウシまたはマウスの全血に予め被検物質を加えてインキュベーションし、コラーゲンを加えて血小板を凝集させた。血小板の凝集抑制効果はセルカウンターを用いて凝集していない血小板を計測し、被検物質の非添加血液と比較して評価した。

凝固反応による評価系

血液凝固反応は、予め被検物質を添加した血漿に外因系あるいは内因系凝固反応開始剤とカルシウム溶液を加え、フィブリンが形

成されて流動性がなくなるのを捉えて検出する方法 (スチールボール法) で評価した。凝固抑制作用の強さは、被検物質を添加したときの凝固時間延長の程度により評価した。

(2) 物質の単離と血栓予防機能の解明

物質の単離

酢酸エチルやヘキサンなどの有機溶媒を用いて抽出後、シリカゲルカラムを用いたオープンカラムクロマトフィーや ODS カラムを用いた逆相 HPLC により成分を分画した。

PAI-1 産生抑制に必要な構造の検討

培養細胞による評価系を利用し、TNF 刺激による PAI-1 産生増加の低下作用を指標に化合物の構造と抑制活性の相関を評価した。またリアルタイム PCR 法により HUVEC の PAI-1 mRNA 発現量への影響を調べた。

血小板凝集抑制に必要な構造の検討

コラーゲン刺激後の血小板凝集の抑制を指標に化合物の構造と抑制活性の相関を評価した。

凝固反応への作用点の評価

外因系凝固反応、内因系凝固反応のどちらに作用しているかを明らかにした後、どの凝固系因子による反応に作用しているかを、凝固法や合成基質法により評価した。

(3) マウスを用いた検討

加齢マウスでの検討では、0.5~0.75% の被検物質を含んだ固型飼料を 5~7 週齢の ICR マウス摂取させ 15 ヶ月齢まで飼育した後、血液を肝臓や心臓などの臓器を採取した。血液からは血漿を調製して血中の凝固関連因子の活性や抗原量を測定し、臓器からは RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により凝固関連因子の mRNA を定量した。

in vivo の血小板凝集の抑制活性は、tail bleeding 法によって評価した。

動物実験は、帝京大学動物実験に関する倫理委員会の承認後、同委員会が定めるガイドラインに基づいて行った。

4. 研究成果

(1) 健康食からの血栓予防成分の探索と基礎検討

明日葉の黄汁から精製した複数のカルコンを用いて検討し、その中のキサントアンゲロールに血小板凝集抑制作用と線溶系の阻害物質であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1) の産生を抑制する作用の 2 つの血栓症の予防に繋がる活性があることを明らかにした。また、明日葉黄汁から精製した構造が異なるカルコンの阻害活性と比較することにより、キサントアンゲロールのゲラニル基が活性発現に重要であることを明らかにした (Ohkura et al. *J Intercult Ethnopharmacol.* 4(4):355-7. 2015)。

さらに、プロポリスに含まれる天然物から PAI-1 産生抑制を指標に見出したフラボノイ

ドの一種のクリシンについて、クリシンの誘導体を用いて構造と活性の関連を調べた。その結果、5位と7位に2つの水酸基が結合していることが重要であることがわかった(投稿中)。

凝固反応による評価系を用いて、黒酢と黒酢醗の分画物について、抗凝固作用があるかどうかを調べたが、今回の検討で抗凝固物質は見いだせなかった。一方、生薬抽出物を対象に抗凝固物質の探索を行ったところ、凝固反応を促進する生薬抽出物が複数見つかった。本テーマの目的とは異なるものが見出されたわけであるが、本研究の一つの成果として長年使われてきた生薬から、これまでに知られていなかった新たな止血物質開発の可能性が見出されたと考えている(*J Intercult Ethnopharmacol.* 4(1):19-23. 2015)。

(2) マウスを用いた検討

マウスによる検討では、明日葉の黄汁の経口投与がマウスの体内で血小板凝集を抑制する可能性があることを示した。また血小板凝集の抑制を、全血を用いた血小板凝集測定とマウスを用いた *in vitro* での評価系で検討し、黄汁から精製したキサントアンゲロールが血小板凝集を抑制すること、キサントアンゲロールのゲラニル基が活性発現に重要であることなどを明らかにした(投稿中)。また、プロポリスを混餌投与したマウスでは、炎症性刺激によって血栓傾向を誘導したマウスの血中 PAI-1 上昇が抑制されることを示した(投稿中)。黒酢のマウスの血栓傾向モデルでの有効性については、今後の追加検討が必要である。

(3) 加齢による血栓傾向への効果の検討

明日葉の黄汁を摂取したマウスでは、老化に伴う血栓形成傾向が抑制されることを示した(第38回日本血栓止血学会学術集会 発表予定)。

また、加齢による凝固関連因子の日内リズムへの影響を効率的に調べる目的で加齢促進マウス(SAM マウス)を用いた検討を行い、SAM マウスが血栓傾向を改善する食品の評価に有効である可能性を示した。

明日葉の以外の健康食品については、研究期間内に加齢マウスでの有効性を示すことはできなかった。また、凝固系の日内リズムの改善効果については、明日葉と上記の SAM マウスを用いて解明を試みたが、研究期間内に有効性を明らかにすることは出来なかった。

本研究では、明日葉やプロポリスなどの抗血栓作用の機序の一端を明らかにすると共に、加齢マウスモデルでの有効性も示すことができた。本研究の成果は健康食を利用して高齢者の血栓性疾患を予防する機能性食品の開発に繋がるものであると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Ishibashi K, Nehashi K, Oshima T, Ohkura N, Atsumi G. (2016)
Differentiation with elaidate tends to impair insulin-dependent glucose uptake and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Food Sci Nutr.* 67(2):99-110. DOI:10.3109/09637486.2016.1144721. (査読有)

Ohkura N, Oiwa H, Ohnishi K, Taniguchi M, Baba K, Atsumi G. (2015)
Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 release from human endothelial cells by Angelica keiskei Koidzumi (Ashitaba) chalcones is structure-dependent. *J Intercult Ethnopharmacol.* 4(4):355-7. DOI:10.5455/jice.20150910123122. (査読有)

Ohkura N, Yokouchi H, Mimura M, Nakamura R, Atsumi G. (2015)
Screening for hemostatic activities of popular Chinese medicinal herbs in vitro. *J Intercult Ethnopharmacol.* 4(1):19-23. DOI:10.5455/jice.20141128032845. (査読有)

Ohkura N, Oishi K, Atsumi G. (2015)
Blood coagulation and metabolic profiles in middle-aged male and female *ob/ob* mice. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 26(5):522-6. DOI:10.1097/MBC.0000000000000267. (査読有)

Ohkura N, Oishi K, Nakakuki Y, Miura M, Atsumi G. (2013)
Lipopolysaccharide-induced plasma PAI-1 increase does not correlate with PAI-1 synthesised de novo in the liver. *Thromb Res.* 132(3):398-9. doi:10.1016/j.thromres.2013.06.008. (査読有)

Natori Y, Ohkura N, Nasui M, Atsumi G, Kihara-Negishi F. (2013)
Acidic sialidase activity is aberrant in obese and diabetic mice. *Biol Pharm Bull.* 36(6):1027-31. (査読有)

Oishi K, Koyanagi S, Ohkura N. (2013)
The molecular clock regulates circadian transcription of tissue factor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(2):332-5. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.

12.098 (査読有)

Oishi K, Ohkura N. (2013)
Chronic circadian clock disruption induces expression of the cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 24(1):106-8. DOI:10.1097/MBC.0b013e32835bdfdf3. (査読有)

[学会発表](計18件)

大藏直樹、厚味巖一、大石勝隆、藤波綾、谷口雅彦、太田光熙、大西克典 (2016年6月発表予定)
明日葉カルコンのマウスモデルにおけるPAI-1上昇抑制効果 (第38回日本血栓止血学会学術集会) 奈良県奈良市 奈良春日野国際フォーラム

大藏直樹、肥後(山本)明花、大石勝隆 (2016年6月発表予定)
睡眠障害モデルマウスにおける高脂肪高シヨ糖食負荷及びLPS接種の血液凝固線溶系に与える影響 (第38回日本血栓止血学会学術集会) 奈良県奈良市 奈良春日野国際フォーラム

山本幸織、大藏直樹、大池秀明、大石勝隆 (2015年9月)
体内時計に作用する生薬成分の探索 (第2回時間栄養科学研究会 / 第10回 NutriRhythm (ニュートリズム) 検討会) 東京都新宿区 早稲田大学 国際会議場

大藏直樹、厚味巖一、谷口雅彦、大石勝隆 (2015年9月)
血液凝固系の日内変動と食品や薬用植物由来の止血血栓制御物質 (第2回時間栄養科学研究会 / 第10回 NutriRhythm (ニュートリズム) 検討会) 東京都新宿区 早稲田大学 国際会議場

大藏直樹、厚味巖一、大西克典、馬場きみ江、谷口雅彦 (2015年9月)
明日葉が持つ抗血栓作用の可能性と作用発現に重要なカルコンの構造 (日本生薬学会第62回年会) 岐阜県岐阜市長良川国際会議場

大石勝隆、肥後明花、大藏直樹 (2015年5月)
睡眠障害モデルマウスを用いた血液凝固線溶機能の解析 (第37回日本血栓止血学会学術集会) 山梨県甲府市 甲府市総合市民会館

大藏直樹、大西克典、大石勝隆、大岩広明、薄葉ゆかり、藤田真緒、加藤一輝、藤井文音、石橋賢一、谷口雅彦、馬場きみ江、厚

味巖一 (2015年5月)
明日葉カルコンの抗血栓作用の可能性と作用発現に重要な構造 (第37回日本血栓止血学会学術集会) 山梨県甲府市 甲府市総合市民会館

藤田真緒、中山亜希子、薄葉ゆかり、藤井文音、大西克典、谷口雅彦、馬場きみ江、大藏直樹、厚味巖一 (2015年3月)
明日葉カルコンが示す血小板凝集の抑制作用 (日本薬学会第135年会) 兵庫県神戸市 神戸学院大学他

大藏直樹、大岩広明、谷口雅彦、大西克典、馬場きみ江、厚味巖一 (2014年12月)
プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)産生抑制効果における明日葉 Xanthoangelol のゲラニル基の重要性 (第12回日本機能性食品医用学会) 京都府京都市 国立京都国際会館

山本幸織、大藏直樹、大池秀明、大石勝隆 (2014年11月)
生薬由来成分ケイ皮酸の体内時計制御作用 (第21回日本時間生物学会学術大会) 福岡県福岡市 九州大学医学部

中谷絵理子、石橋賢一、大藏直樹、厚味巖一 (2014年10月)
脂肪細胞由来マイクロパーティクルの血液凝固亢進作用について (第58回日本薬学会関東支部大会) 東京都町田市 昭和薬科大学

大藏直樹、根岸 由貴、厚味巖一 (2014年5月)
生薬からの抗血栓性物質の探索 (第36回日本血栓止血学会学術集会) 大阪市天王寺区 大阪国際交流センター

大藏直樹、小林慶子、立藤智基、厚味巖一 (2014年5月)
ブラジル産プロポリスが持つ抗血栓作用の可能性の検討 (第36回日本血栓止血学会学術集会) 大阪市天王寺区 大阪国際交流センター

大岩広明、大藏直樹、中久木義孝、谷口雅彦、芝野真喜雄、大西克典、馬場きみ江、厚味巖一 (2014年3月)
明日葉カルコンの PAI-1 産生抑制効果と構造の関連性 (日本薬学会第134年会) 熊本県熊本市 熊本大学他

大藏直樹、小林慶子、立藤智基、厚味巖一 (2013年11月)
プロポリスの血栓を予防する機能性食品としての可能性 (第18回日本フードファクター学会) 東京都世田谷区 東京農業大学世田谷キャンパス

根岸由貴、大藏直樹、西井綾香、西山和沙、忍足鉄太、高橋秀依、夏苜英昭、厚味巖一
(2013年10月)

センノシドが持つ抗血栓作用の可能性
(第57回 日本薬学会関東支部大会) 東京都板橋区 帝京大学板橋キャンパス

中谷絵理子、藤井昭菜、石橋賢一、大藏直樹、厚味巖一 (2013年10月)
血液凝固亢進作用を示す脂肪細胞由来マイクロパーティクルの解明 (第57回日本薬学会関東支部大会) 東京都板橋区 帝京大学板橋キャンパス

大藏直樹、白倉美寿々、中谷絵理子、大石勝隆、厚味巖一 (2013年5月)
肥満マウスの血中に増加するPAI-1への脂肪以外の組織が産生するPAI-1の関与
(第35回日本血栓止血学会学術集会) 山形県山形市 山形国際ホテル

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大藏 直樹 (OHKURA NAOKI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60349256

(2) 研究分担者

大石 勝隆 (Oishi KATSUTAKA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：60349256

研究者番号：60349256

厚味 巖一 (ATSUMI GEN-ICHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：70276608

忍足 鉄太 (OSHITARI TETSUTA)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00279043

(3) 連携研究者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI MASAHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00278590